

بسم الله الرحمن الرحيم



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین
دانشکده پیراپزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی

عنوان:

بررسی اثرات اسیدهای چرب امگا-۳، -۶ و -۹ بر بیان پروتئین ErK از
مسیر MAPK در رده سلولی SKOV-3 مربوط به سرطان تخمدان

پژوهشگر:

سعیده حاجی قاسمی

اساتید راهنما:

دکتر نعمت الله غیبی - دکتر مرتضی کریمی پور

استاد مشاور:

دکتر مهدی آزاد

زمستان ۱۳۹۴

تقدیر و سپاسگزاری

در ابتدا از خداوند منان سپاسگزارم که به من فرصت و توانایی عنایت فرمود تا در این راه قدم بگذارم.

از زحمات پدر و مادر گرانقدرم و نیز خواهر عزیزم که بی دریغ من را حمایت کرده و همیشه مشوق و همراه بوده اند قدردانی می کنم.

سپاسگزاری و قدردانی

از اساتید راهنمای محترم جناب آقای دکتر غیبی و جناب آقای دکتر کریمی پور که بزرگوارانه و صبورانه با مساعدت هایشان راه گشای انجام این تحقیق شدند، کمال تشکر را دارم.

از صبوری ها و راهنمایی های استاد محترم مشاور جناب آقای دکتر آزاد در طول مدت انجام این پروژه نهایت قدردانی را می نمایم.

از جناب آقای دکتر رحیمی و سرکار خانم دکتر تفسیری، بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور تهران، بابت کمک های علمی بی دریغشان کمال سپاس را دارم.

در نهایت از کلیه ی پرسنل بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور تهران بابت همکاری و مساعدت هایشان صمیمانه تشکر می کنم.

امید آنکه این اثر پژوهشی مورد قبول اساتید گرامی قرار بگیرد.

چکیده

زمینه و هدف: علی رغم پیشرفت های اخیر در زمینه درمان سرطان، این بیماری همچنان به عنوان یک مشکل سلامت عمومی در بسیاری از نقاط جهان پابرجاست. در این میان سرطان اپی تلیال تخمدان یکی از کشنده ترین و مقاوم به درمان ترین سرطان ها در میان سرطان های درگیر کننده ی خانم ها می باشد. یک رویکرد جدید در شیمی درمانی این پتانسیل را دارد که ترکیبات دارویی - غذایی، غذایی - دارویی و یا دارویی - دارویی را به وجود آورد که می توانند حفاظت افزایشی یا حتی سینرژستیکی در برابر پیشرفت سرطان ها داشته باشند. مدارک قابل ملاحظه ای وجود دارد که نشان می دهد اسیدهای چرب غیر اشباع، علاوه بر نقشی که به عنوان منبع انرژی دارند، می توانند هم بر شروع و هم بر پیشرفت سرطان اثر بگذارند.

روش کار: در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک اسیدهای چرب امگا-۳، امگا-۶ و امگا-۹ بر رده سلولی SKOV-3 (آدنوکارسینومای تخمدان انسان) با استفاده از تست MTT بررسی گردید. سپس با استفاده از کیت رنگ آمیزی Annexin-V-FLUOS میزان آپوپتوز القاء شده در این سلول ها اندازه گیری شد. در نهایت با انجام western blotting برای پروتئین ErK در دو حالت فسفریله و غیرفسفریله به بررسی اثر این اسیدهای چرب بر مسیر سیگنال دهی MAPK پرداخته شد.

یافته ها: برطبق مشاهدات، اسیدهای چرب غیر اشباع لینولئیک اسید و اولئیک اسید (به ترتیب امگا-۶ و -۹) در غلظت های پایین تر از $500 \mu M$ رشد سلول ها را افزایش داده و در غلظت های بالاتر از این مقدار اثر کشندگی داشته اند. این در حالیست که دو اسید چرب آلفا-لینولئیک اسید و آراشیدونیک اسید (به ترتیب امگا-۳ و -۶) در غلظت های استفاده شده، تأثیری بر رشد سلول های SKOV-3 نداشته اند. همچنین مشخص شد که اثر سایتوتوکسیک این اسیدهای چرب به علت توانایی آن ها در القاء آپوپتوز می باشد. متعاقب انجام western blotting مشخص شد که اسیدهای چرب لینولئیک اسید و اولئیک اسید فعالیت پروتئین ErK را کاهش می دهند.

نتیجه گیری: برخی از اسیدهای چرب غیراشباع بر بعضی از سلول های سرطانی اثر دوگانه اعمال می کنند و این اثر به نوع و غلظت اسید چرب و نیز سلول سرطانی هدف بستگی دارد.

کلمات کلیدی: SKOV-3، تست MTT، آپوپتوز، لینولئیک اسید، اولئیک اسید، ErK

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه و اهمیت موضوع	
۱-۱- مقدمه	۲
۲-۱- اهمیت موضوع و ضرورت انجام تحقیق	۳
۳-۱- اهداف پژوهش	۸
۱-۳-۱- هدف اصلی	۸
۲-۳-۱- اهداف فرعی	۸
۳-۳-۱- اهداف کاربردی	۸
۴-۱- فرضیات	۸
فصل دوم: مروری بر مطالعات انجام شده	
۱-۲- گیرنده ی TrK B و سرطان	۱۰
۲-۲- مسیر انتقال سیگنال MAPK	۱۱
۳-۲- اسیدهای چرب غیر اشباع	۱۳
۱-۳-۲- متابولیسم اسیدهای چرب غیر اشباع	۱۵
۲-۳-۲- فعالیت اسید های چرب ضروری و متابولیت هایشان	۱۹
۳-۳-۲- اسید های چرب ضروری و التهاب	۲۱
۴-۲- اسیدهای چرب غیر اشباع و سرطان	۲۲
۱-۴-۲- اسیدهای چرب غیر اشباع و پیشگیری از سرطان	۲۳
۲-۴-۲- اسیدهای چرب غیر اشباع و پیشرفت سرطان	۲۶
۵-۲- مطالعات پیشین	۳۰
فصل سوم: مواد و روش ها	
۱-۳- مواد مصرفی	۴۰
۲-۳- تجهیزات	۴۱
۳-۳- کشت سلول	۴۱
۱-۳-۳- پاساژ سلولی (sub culture)	۴۲
۲-۳-۳- تعویض محیط کشت	۴۳

۴۴	۳-۳-۳- فریز کردن سلول ها
۴۴	۳-۳-۴- دفریز (ذوب) کردن سلول ها
۴۵	۳-۳-۵- شمارش سلولی
۴۶	۳-۴- تست MTT (MTT assay)
۴۸	۳-۵- فلوسایتومتری
۵۰	۳-۶- وسترن بلائینگ
۵۰	۳-۶-۱- استخراج پروتئین
۵۲	۳-۶-۲- اندازه گیری غلظت پروتئین با روش برادفورد
۵۲	۳-۶-۳- آماده سازی ژل SDS-PAGE
۵۴	۳-۶-۴- آماده سازی پروتئین ها برای loading در SDS-PAGE
۵۵	۳-۶-۵- مرحله بلائینگ (ترانسفر)
۵۶	۳-۶-۶- بلاکینگ (Blocking)
۵۶	۳-۶-۷- شناسایی پروتئین توسط آنتی بادی اختصاصی
	فصل چهارم: یافته ها
۵۹	۴-۱- اثرات اسیدهای چرب غیر اشباع بر viability سلول
۶۳	۴-۲- میزان IC50
۶۳	۴-۳- نتایج فلوسایتومتری
۶۸	۴-۴- نتایج حاصل از وسترن بلات
	فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری
۷۰	۵-۱- بحث
۷۷	۵-۲- نتیجه گیری
۷۹	پیشنهادات
۸۰	فهرست منابع
۹۱	چکیده انگلیسی

فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲: بازه ی غلظتی مورد استفاده و غلظت های آستانه ی بدست آمده در مطالعات مشابه	۳۸
جدول ۱-۳: مواد اولیه برای SDS-PAGE	۵۳
جدول ۲-۳: مواد مورد نیاز برای تهیه ژل SDS-PAGE	۵۳
جدول ۱-۴: مقدار IC50 برای اسیدهای چرب دارای اثر سایتوتوکسیک	۶۳

فهرست نمودارها

عنوان	صفحه
نمودار ۴-۱: اثر غلظت های مختلف اسیدهای چرب بر viability سلول های SKOV-3 در گذر زمان.....	۵۹
نمودار ۴-۲: اثر اسید چرب α -لینولئیک اسید (امگا-۳) بر viability سلول های SKOV-3 پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار	۶۰
نمودار ۴-۳: اثر اسید چرب لینولئیک اسید (امگا-۶) بر viability سلول های SKOV-3 پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار	۶۰
نمودار ۴-۴: اثر اسید چرب آراشیدونیک اسید (امگا-۶ بلند زنجیر) بر viability سلول های SKOV-3 پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار	۶۱
نمودار ۴-۵: اثر اسید چرب اولئیک اسید (امگا-۹) بر viability سلول های SKOV-3 پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار	۶۱
نمودار ۴-۶: بررسی فلوسایتومتری متعاقب ۲۴ ساعت تیمار سلول های SKOV-3 با غلظت ۶۰۰ میکرومولار از اسیدهای چرب LA و OA	۶۴
نمودار ۴-۷: بررسی فلوسایتومتری متعاقب ۴۸ ساعت تیمار سلول های SKOV-3 با غلظت ۶۰۰ میکرومولار از اسیدهای چرب LA و OA	۶۴
نمودار ۴-۸: بررسی فلوسایتومتری متعاقب ۷۲ ساعت تیمار سلول های SKOV-3 با غلظت ۶۰۰ میکرومولار از اسیدهای چرب LA و OA	۶۴

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۲: مسیرهای انتقال سیگنال Trk B	۱۱
شکل ۲-۲: مسیر انتقال سیگنال MAPK	۱۳
شکل ۳-۲: ساختار شیمیایی دو پیش ساز تمام PUFA ها؛ لینولئیک اسید و α -لینولئیک اسید	۱۴
شکل ۴-۲: متابولیسم پایه ی اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶	۱۸
شکل ۳-۱: مکانیسم مولکولی تست MTT	۴۶
شکل ۳-۲: دستگاه فلوسایتومتر	۴۹
شکل ۴-۱: اثرات اسیدهای چرب ALA، OA، LA و AA بر viability سلول های SKOV-3 پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت	۶۲
شکل ۴-۲: نتیجه حاصل از فلوسایتومتری برای سلول های SKOV-3 پس از تیمار ۲۴ ساعته با LA در غلظت μM	۶۰۰
شکل ۴-۳: نتیجه حاصل از فلوسایتومتری برای سلول های SKOV-3 پس از تیمار ۴۸ ساعته با LA در غلظت μM	۶۵
شکل ۴-۴: نتیجه حاصل از فلوسایتومتری برای سلول های SKOV-3 پس از تیمار ۷۲ ساعته با LA در غلظت μM	۶۶
شکل ۴-۵: نتیجه حاصل از فلوسایتومتری برای سلول های SKOV-3 پس از تیمار ۲۴ ساعته با OA در غلظت μM	۶۶
شکل ۴-۶: نتیجه حاصل از فلوسایتومتری برای سلول های SKOV-3 پس از تیمار ۴۸ ساعته با OA در غلظت μM	۶۷
شکل ۴-۷: نتیجه حاصل از فلوسایتومتری برای سلول های SKOV-3 پس از تیمار ۷۲ ساعته با OA در غلظت μM	۶۷
شکل ۴-۸: نتایج حاصل از وسترن بلات برای پروتئین Erk در دو حالت فسفریله و غیر فسفریله	۶۸